

⑯ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑯ Patentschrift  
⑯ DE 196 52 183 C 1

⑯ Int. Cl. 6:  
A 61 K 35/78  
A 61 K 31/565

⑯ Aktenzeichen: 196 52 183.1-41  
⑯ Anmeldetag: 14. 12. 96  
⑯ Offenlegungstag: —  
⑯ Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung: 12. 2. 98

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

⑯ Patentinhaber:

Schaper & Brümmer GmbH & Co. KG, 38259  
Salzgitter, DE

⑯ Vertreter:

GRAMM, LINS & PARTNER, 38122 Braunschweig

⑯ Erfinder:

Neßelhut, Thomas, Dr., 37075 Göttingen, DE;  
Bodinet, geb. Ernwein, Cornelia, 38259 Salzgitter,  
DE; Schneider, Peter, Dr.Dr., 38259 Salzgitter, DE;  
Freudenstein, Johannes, Dr., 38640 Goslar, DE

⑯ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit  
in Betracht gezogene Druckschriften:

US 55 69 459  
RAUTHE, G.: Fortschr. Med. 114(1996) 26/46-30/48;  
NEßELHUT, T. et.al.: Arch. Gynecol. Obstet. 254/1-4(1993) 817-818;

⑯ Verwendung eines Extraktes aus Cimicifuga racemosa

⑯ Die Wirkung eines standardmäßig zur Behandlung östrogenabhängiger Tumore eingesetzten antiöstrogenen Wirkstoffs wird potenziert durch die gleichzeitige Gabe eines Extraktes aus Cimicifuga racemosa, vorzugsweise in Dosierungen zwischen 5 mg und 500 mg Droge pro Tag.

DE 196 52 183 C 1

BEST AVAILABLE COPY

DE 196 52 183 C 1

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft die Verwendung eines Extraktes aus *Cimicifuga racemosa* zur Behandlung östrogen-abhängiger Tumore.

Extrakte aus dem Wurzelstock der Traubensilberkerze (*Cimicifugae racemosae rhizoma*) weisen östrogenähnliche Effekte auf. In den Extrakten sind Komponenten gefunden worden, die spezifisch an Östrogenrezeptoren binden und bei ovarektomierten Ratten die Gonadotropinspiegel senken können. Die Verabreichung dieser Extrakte zur Behandlung klimakterischer Beschwerden und Dysmenorrhö hat sich daher bewährt.

Für Mammakarzinom-Risikopatienten verbietet sich die Anwendung von östrogenhaltigen Arzneimitteln zur Regulierung von klimakterischen Beschwerden, da die Ausbreitung von östrogenabhängigen Tumoren naturgemäß durch Östrogengaben verstärkt wird. Der Mechanismus der Wirkungsweise für die östrogen-analogen Substanzen noch unklar ist, ist vorsorglich für die Verabreichung dieser Substanzen ein Risiko für östrogenabhängige Tumore als Kontraindikation angesehen worden.

Es ist zwar bereits berichtet worden (Nesselhut et al. in TW Gynäkologie (1993) Seiten 249 bis 250), daß die Phytopharmaka Rhaponticin und *Cimicifuga*-Extrakt in niedrigeren Konzentrationen die Proliferation von Karzinomzellen *in vitro* verstärken, in höheren Konzentrationen hingegen möglicherweise hemmen.

Eine Verifizierung dieser Ergebnisse ist nicht publiziert worden, so daß das Verbot der Verabreichung von Phytopharmaka mit östrogen-analoger Wirkung für Risikopatienten bezüglich östrogenabhängiger Tumore weiterhin besteht.

Es ist bekannt, östrogenabhängige Tumore mit einem antiöstrogenen Wirkstoff zu therapieren. Der gängigste Wirkstoff dieser Art ist derzeit Tamoxifen (Z-2-[4-(1,2-Diphenyl-1-Butenyl)Phenoxy]-N,N-Dimethylamin).

Für die Patienten, die mit einem derartigen Antiöstrogen behandelt wurden, kam aus den oben erwähnten Gründen eine Regulierung der klimakterischen Beschwerden durch Östrogene oder östrogenanaloge Substanzen nicht in Betracht.

Eine Hemmung der Proliferation von Mammatumorzellen ist abhängig von der Konzentration des Tamoxifens. Der Erhöhung der Konzentration in einen Bereich hinein, wo die Proliferation der Tumorzellen sicher verhindert wird, ist jedoch nicht möglich, da Tamoxifen in diesen Konzentrationen toxisch wird.

Die vorliegende Erfindung geht daher von der Problemstellung aus, eine Tumortherapie auch mit niedrigeren Antiöstrogen-Konzentrationen zu ermöglichen.

Erfindungsgemäß wird hierzu in Kombination mit dem Antiöstrogenen Wirkstoff ein Extrakt aus *Cimicifuga racemosa* verwendet.

Überraschenderweise hat sich herausgestellt, daß der Extrakt aus *Cimicifuga racemosa* die Proliferation von östrogenabhängigen Tumorzellen nicht nur nicht verstärkt sondern in Kombination mit einem antiöstrogenen Wirkstoff dessen polierationshemmende Wirkung deutlich verstärkt, so daß auch eine vollständige Proliferationshemmung erreichbar ist, ohne in den Bereich der Toxizitätsgrenze für den antiöstrogenen Wirkstoff geraden zu müssen.

Die Potenzierung der Wirkung eines antiöstrogenen Wirkstoffes ist anhand des Standard-Wirkstoffes Tamoxifen genauer untersucht worden. Andere Experimente geben Hinweise darauf, daß auch die antiöstrogene Wir-

kung von Genistein durch einen Extrakt aus *Cimicifuga racemosa* verstärkt wird. Bevorzugte Verdünnungen des Extraktes liegen im Bereich zwischen  $10^{-3}$  und  $10^{-5}$ , da Verdünnungen bis  $10^{-2}$  in vitro toxische Effekte hervorbringen. Bevorzugte Dosierungen liegen zwischen etwa 5 mg und 500 mg Droge pro Tag.

Die erfindungsgemäße Wirkung des *Cimicifuga*-Extraktes auf die Proliferation von östrogenabhängigen Karzinomzellen, insbesondere Mammakarzinomzellen, ist *in vitro* mit einem Testsystem aus MCF-7 Zellen erfolgt.

Die MCF-7 Zelllinie ist ein etabliertes *in vitro* Modell für östrogenabhängige Tumore, die sowohl Östrogenrezeptoren als auch Aromataseaktivität besitzen. Die menschliche Brustkrebslinie wurde abgeleitet von einer Pleuraeffusion bei einem metastasierenden Brusttumor und besitzt signifikante Mengen an  $17\beta$  Rezeptoren (Schwarze, A. (1994) Wirkspktrum ausgewählter Flavonoide auf die humane Brustkrebslinie MCF-7: Eine *in vitro* Studie. Witten-Herdecke, Universität, Bereich Medizin, Diss. 1994).

Der Einfluß von *Cimicifuga*-Extrakt auf die Proliferation der MCF-7 Zellen wurde anhand des Einbaus von radioaktiv markiertem Thymidin bestimmt.

## Material und Methoden

## Testsubstanzen

$17\beta$ -Estradiol (Sigma) und Tamoxifencitrat (Sigma) wurden 1-M in DMSO (Dimethylsulfoxid) gelöst und in einer 1 : 10 Verdünnungsreihe in Zellkulturmedium entsprechend weiter verdünnt. *Cimicifuga*-Extrakt wurde in einer 1 : 10 Verdünnungsreihe direkt mit Zellkulturmedium verdünnt.

Herstellung des *Cimicifuga racemosa*-Extraktes

Nach Prüfung auf Identität, Reinheit und Gehalt wurden 30 kg der zerkleinerten Arzneidroge *Cimicifuga racemosa* *rhizoma* für 10 Tage mit 50 l Isopropylalkohol 40% (V/V) mazeriert. Der Extrakt wurde abgelassen und die Droge abgepreßt. Die vereinigten Fraktionen wurden mit Isopropylalkohol 40% (V/V) auf ein Endvolumen von 35 l aufgefüllt.

## Proliferationsassay MCF-7

MCF-7 Zellen wurden von der ATCC (HTB 22) bezogen und in Eagle's MEM (Eagle's Minimal-Essential-Medium) mit nicht-essentiellen Aminosäuren, 1 mM Natriumpyruvat, 10  $\mu$ g/ml Insulin und 10% FKS (Foetales Kälberserum) kultiviert.

Vor Einsatz in den Test wurden die MCF-7 Zellen mindestens eine Passage in Eagleds MEM ohne Phenolrot mit nicht-essentiellen Aminosäuren, 1 mM Natriumpyruvat, 10  $\mu$ g/ml Insulin und 5% FKS (Foetales Kälberserum) gehalten. Um östrogenfreie Wachstumsbedingungen im Test zu erhalten, wurde für den Testassatz das Insulin aus dem Zellkulturmedium entfernt und das FKS durch 5% "Characoal stripped" FKS (CSF) ersetzt.

200  $\mu$ l einer auf  $5 \times 10^4$  c/ml eingestellten Zellsuspension wurden pro Vertiefung in 96er Mikrotiterplatten (Nunc) pipettiert und 24 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Überstände vorsichtig abgenommen und 150  $\mu$ l frisches Zellkulturmedium pro Vertiefung pipettiert.

Die Testsubstanzen wurden gelöst, in Zellkulturmedium verdünnt und in 4 Parallelen a 50 µl/Vertiefung pipettiert. Als Kontrollen wurden Zellkulturmedium sowie die entsprechenden Lösungsmittelverdünnungen jeweils mitinkubiert.

Nach 2–3 Tagen Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurden die Zellen mit 25 µl/Napf (6-<sup>3</sup>H)-Thymidin (Amersham, spez. Aktivität 2 Ci/mMol) für 8 h gepulst. Danach wurden sie nach Standardmethoden (Cell Harvester Inotech) auf Glasfaserfilter geerntet und in einem Flüssig-Szintillations-Counter (Wallac) gezählt. Die Ergebnisse wurden als cpm = "counts per minute" ausgedruckt.

#### Herstellung des "Charcoal-Stripped" FKS (CSF)

1 Tablette "Dextran coated charcoal tablets" (Steranti Separex<sup>®</sup>) wurde in 10 ml FKS aufgelöst. Danach wurde das Serum 2 x 45 min im Wasserbad bei 56°C inaktiviert und im Anschluß bei 3000 rpm 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und über einen Filter mit Porengröße 0,2 µm filtriert.

#### Toxizitätsassay

Zur Bestimmung der Toxizität der einzelnen Prüfsubstanzen wurde ein Fluoreszenzassay mit Hela Suspensionszellen durchgeführt.

Hela-Zellen wurden auf eine Zelldichte von 2,5x10<sup>5</sup> c/ml Medium (Eagle's MEM + 5% FKS) eingestellt und 100 µl der Suspension in 96er Mikrotiterplatten (Nunc) pipettiert. Nach 24 h Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurde eine 1 : 2 Verdünnungsreihe der Testsubstanzen in Medium angelegt und von jeder Verdünnung jeweils 100 µl pro Vertiefung in 4 Parallelen pipettiert. Die Ansätze wurden 48 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Danach wurden die Mikrotiterplatten bei 800 rpm zentrifugiert und die Überstände vorsichtig abgenommen. 200 µl einer Lösung aus 0,1 mg/ml 4-Methylumbelliferylheptanoat in PBS wurden pro Vertiefung pipettiert. Nach 60 min wurden die Fluoreszenzeinheiten pro Vertiefung in einem Mikrotiterplattenfluorimeter (Fluoroskan II) bestimmt.

#### Ergebnisse

Zu Beginn der Untersuchungen wurde zunächst das Testsystem auf seine Sensitivität überprüft. Als Positivkontrolle wurde 17-β Östradiol in Dosierungen von 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-8</sup> bzw. 10<sup>-9</sup> Molar getestet.

In allen drei getesteten Dosierungen induzierte 17-β Östradiol eine Steigerung der Proliferation von MCF-7 Zellen um 80–100% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, wie aus Fig. 1 ersichtlich ist.

Parallel wurde in jedem Testansatz eine Lösungsmittelkontrolle durchgeführt. DMSO bewirkte in der maximal im Test eingesetzten Konzentration keine signifikante Proliferationssteigerung oder -hemmung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

In einem weiteren Ansatz wurde der Einfluß des nicht-steroidalen Antiöstrogens Tamoxifen auf das Testsystem geprüft.

Tamoxifen bewirkte in den Dosierungen 10<sup>-4</sup> und 10<sup>-5</sup>-Molar eine 100%ige bzw. 77%ige Hemmung der Proliferation, in Dosierungen von 10<sup>-6</sup> dagegen eine Steigerung der Einbauraten um 52% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Die antiproliferative Wirkung von Tamoxifen zeigte

sich auch, wenn Tamoxifen zusammen mit einer konstanten Dosis an Östradiol appliziert wurde. Die östrogeninduzierte Proliferationssteigerung konnte dosisabhängig durch Tamoxifen inhibiert werden.

Die Ergebnisse dieser Vorversuche machten deutlich, daß das MCF-7 Testsystem geeignet ist, sowohl östrogene als auch antiöstrogene Wirkungen von Testsubstanzen nachzuweisen.

Um dies zu kontrollieren, wurden in den folgenden Versuchsserien neben Mediumkontrollen und Lösungsmittelkontrollen (Negativkontrollen) jeweils eine Positivkontrolle für östrogene Wirkung, bestehend aus 17-β-Östradiol in einer Dosierung von 10<sup>-7</sup> oder 10<sup>-8</sup>-Molar und eine Positivkontrolle für antiöstrogene Wirkung, bestehend aus Tamoxifen in einer Dosierung von 10<sup>-5</sup>-Molar, mitgeführt.

Bevor der Cimicifuga-Extrakt in das MCF-7 System eingesetzt wurde, wurde dessen Toxizität zunächst in einem Toxizitätsassay mit Hela-Zellen überprüft.

Bis zu einer Verdünnung von 10<sup>-2</sup> zeigte der Extrakt auf dieser Zelllinie toxische Effekte. Ab einer Verdünnung von 10<sup>-3</sup> waren keine Unterschiede zwischen Mediumkontrolle und Testansatz feststellbar (Fig. 2). Um unspezifische cytotoxische Effekte ausschließen zu können, wurde diese Verdünnung daher als Maximaldosis für die Testserien auf MCF-7 Zellen eingesetzt.

Fig. 3 verdeutlicht im Vergleich die Proliferation für das Kontrollsysteem, für eine 10<sup>-5</sup> molare Tamoxifen-Lösung, eine 10<sup>-8</sup> molare Östradiollösung sowie für eine Kombination von Tamoxifen und Östradiol, um auch die durch Tamoxifen verursachte Hemmung von östrogeninduzierten Proliferationen zu verifizieren.

Fig. 3 zeigt ferner die Proliferationshemmung für Kombinationen von 10<sup>-5</sup> molarem Tamoxifen mit Extrakt von Cimicifuga racemosa in verschiedenen 1 : 10-Verdünnungen zwischen 10<sup>-3</sup> und 10<sup>-8</sup>. Es zeigt sich, daß in den Verdünnungen 10<sup>-3</sup> bis 10<sup>-5</sup> die proliferationshemmende Wirkung von Tamoxifen deutlich verstärkt wird, wobei in der Verdünnung 10<sup>-3</sup> die Proliferation vollständig und in der Verdünnung 10<sup>-4</sup> fast vollständig unterdrückt wird. In Verdünnungen von 10<sup>-6</sup> und höher wird die proliferationshemmende Wirkung von Tamoxifen nicht verstärkt.

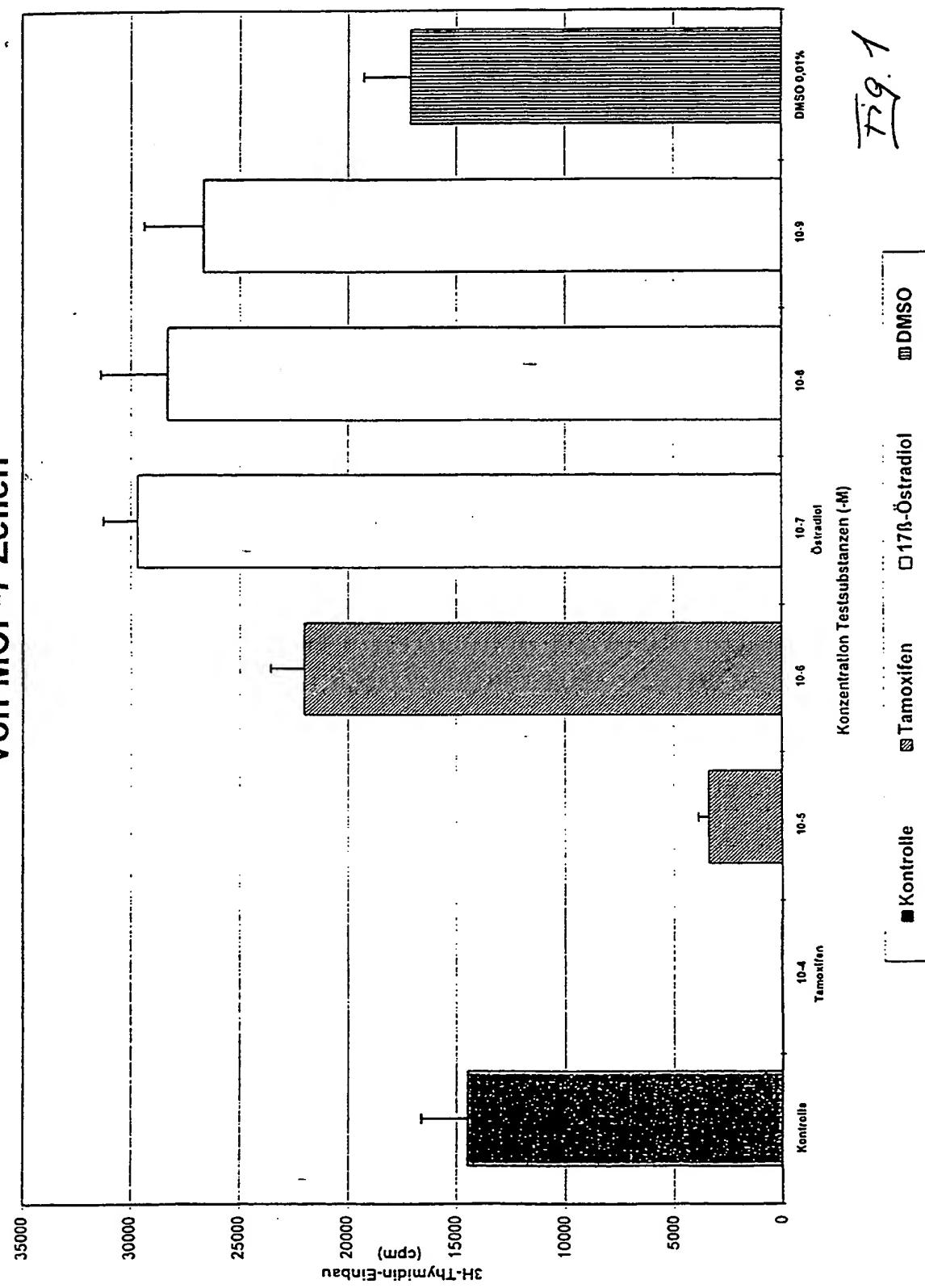
Durch die Kombination von Tamoxifen mit dem Cimicifuga-Extrakt in einer Verdünnung von 10<sup>-3</sup> oder 10<sup>-4</sup> läßt sich daher eine nahezu vollständige Proliferationshemmung der Tumorzellen erreichen, ohne hierfür höhere Tamoxifen-Konzentrationen, beispielsweise 10<sup>-4</sup>-Molar einzusetzen zu müssen, die bereits toxische Effekte zeigen.

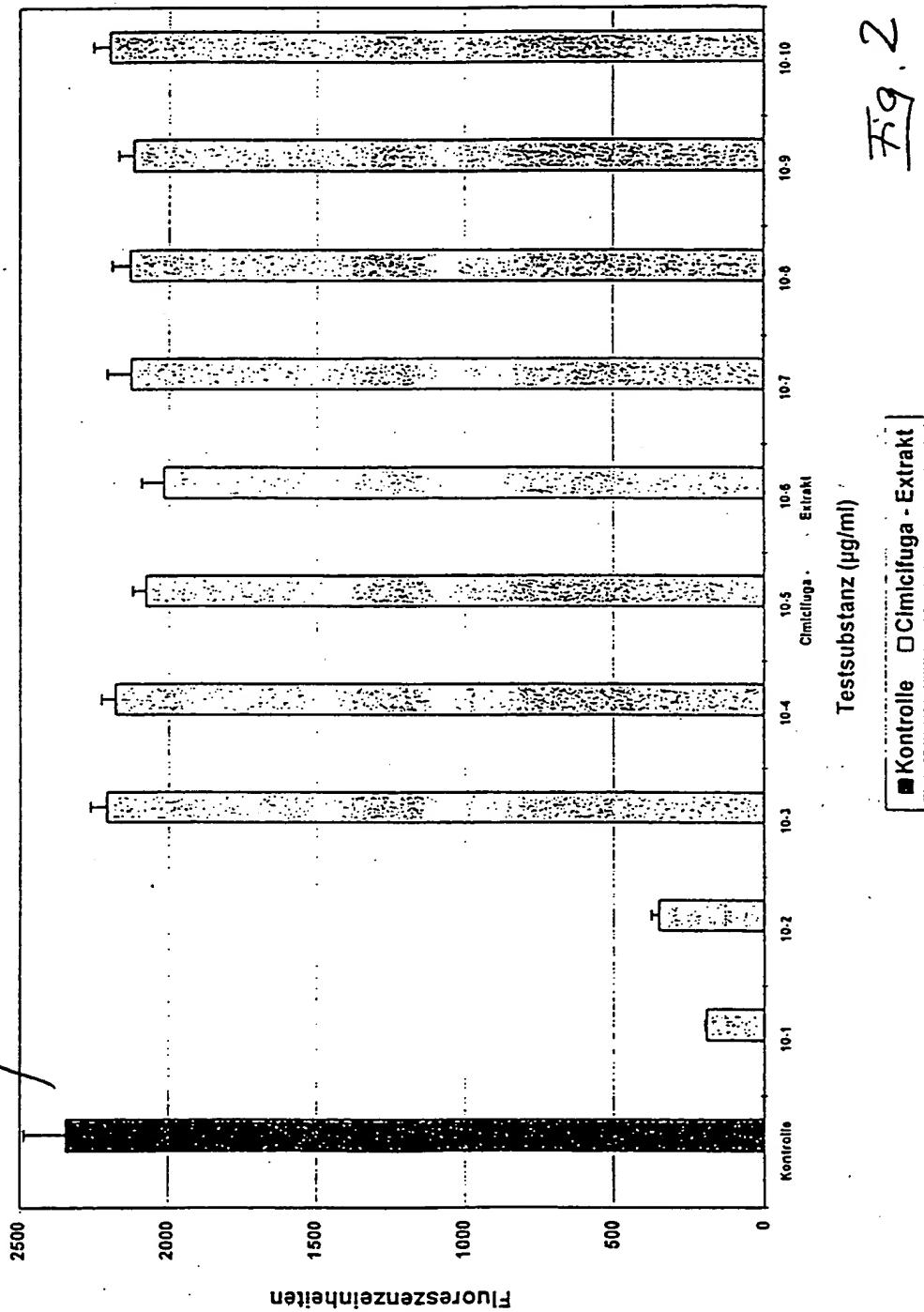
#### Patentansprüche

1. Verwendung eines Extraktes aus Cimicifuga racemosa zur Behandlung östrogenabhängiger Tumore in Kombination mit einem antiöstrogenen Wirkstoff.
2. Verwendung eines Extraktes nach Anspruch 1 in Kombination mit Tamoxifen.
3. Verwendung eines Extraktes nach Anspruch 1 in Kombination mit Genistein.
4. Verwendung eines Extraktes aus Cimicifuga racemosa nach einem der Ansprüche 1 bis 3 in einer Dosierung zwischen 5 mg und 500 mg Droge pro Tag.

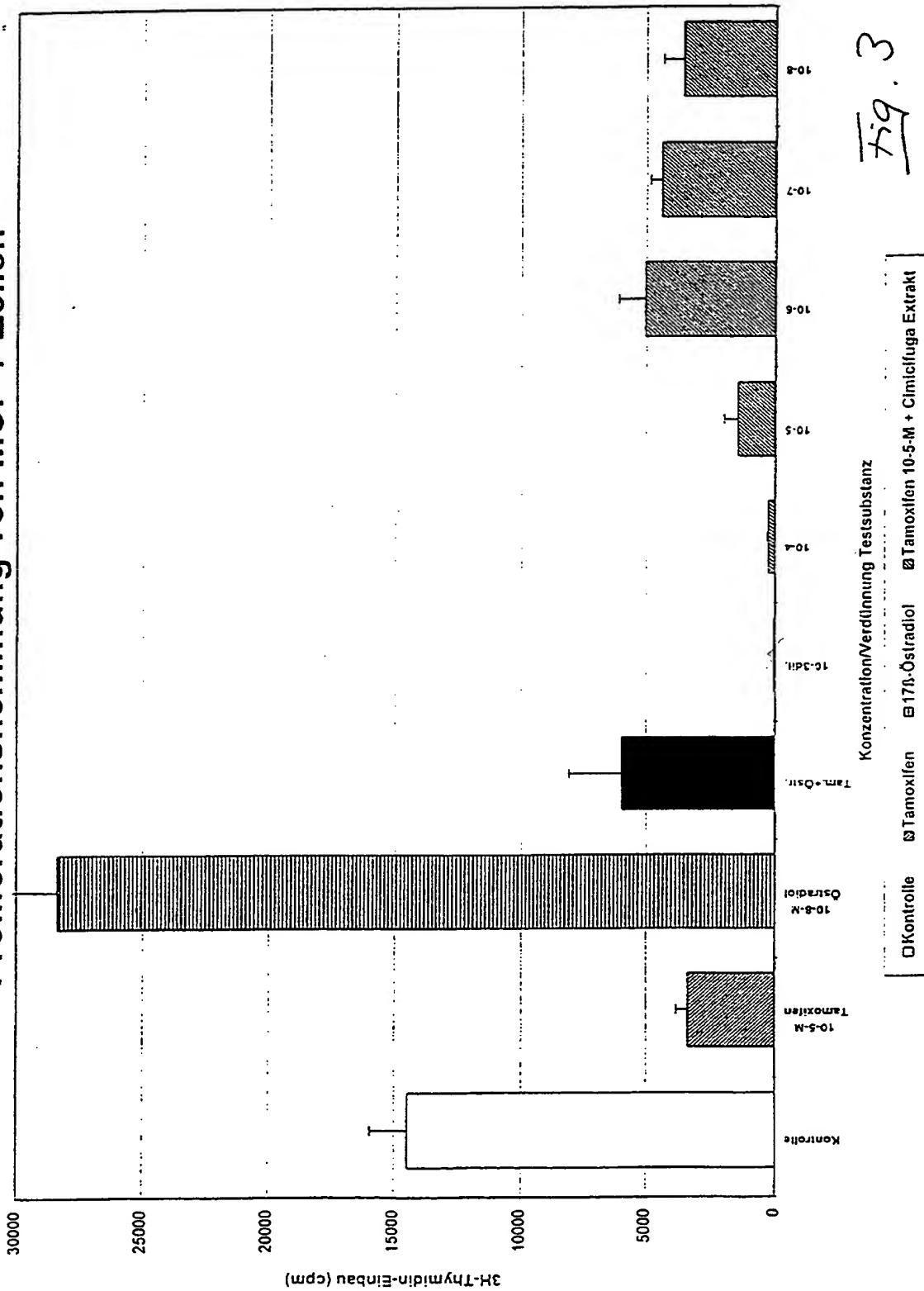
Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

## Einfluß von Östradiol und Tamoxifen auf die Proliferation von MCF-7 Zellen



an  $\text{MCF-7}$  Toxizitätsbestimmung

Einfluß von Cimicifuga Extrakt auf die tamoxifeninduzierte  
Proliferationshemmung von MCF-7 Zellen



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

This Page Blank (uspto)